

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ TẠO CỤ SÂM NGỌC LINH (*PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV.) *IN VITRO* VÀ XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG SAPONIN TRONG CÂY TẠO TỪ CỤ TRỒNG THỬ NGHIỆM Ở NÚI NGỌC LINH

Hoàng Xuân Chiến¹, Ngô Thanh Tài¹, Nguyễn Bá Trục¹, Trần Xuân Tinh¹, Lâm Bích Thảo², Trần Công Luận², Dương Tấn Nhựt¹

¹Viện Sinh học Tây Nguyên

²Trung tâm Sâm và Dược liệu thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh là một cây thuốc quý của Việt Nam, với nỗ lực bảo tồn và phát triển loài được liệu quý này thì ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô được xem như là một giải pháp hiệu quả. Việc tạo củ *in vitro* góp phần làm tăng sức sống của cây, nâng cao tỷ lệ sống sót khi đưa cây ra ngoài vườn ươm. Trong nghiên cứu này, quy trình tạo củ *in vitro* và xác định hàm lượng saponin ở các cây trồng thử nghiệm 17 tháng tuổi đã được trình bày. Các hệ phức hợp của GA/ABA và auxin/cytokinin trong quá trình hình thành củ cũng đã được khảo sát. Nồng độ ABA thích hợp nhất cho quá trình tạo củ là 3,0 mg/l. GA₃ ức chế khả năng tạo củ *in vitro* cây sâm Ngọc Linh. Các chồi cây sâm Ngọc Linh *in vitro* được cảm ứng đẻ tạo củ thành công trên môi trường SH có bổ sung 1,0 mg/l NAA và 2,0 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Nồng độ đường sucrose tốt nhất cho quá trình tạo củ sâm là 50 g/l. Hàm lượng saponin trong củ của những cây 17 tháng tuổi nuôi trồng ngoài tự nhiên cũng đã được xác định là G-Rb₁ (0,21%), G-Rg₁ (0,17%), MR₂ (0,77%).

Từ khóa: ABA, củ, GA, G-Rb₁, G-Rg₁, MR₂, *Panax vietnamensis*, saponin, sâm Ngọc Linh

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh là một loài sâm đặc hữu của Việt Nam với tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. Dù chỉ mới được biết đến từ năm 1973, nhưng qua nghiên cứu các nhà khoa học đã nhận thấy sâm Ngọc Linh không chỉ có các tác dụng dược lý đặc trưng của chi Nhân sâm mà còn có những tác dụng điển hình như chống stress, chống trầm cảm, tác dụng lên sự chống oxy hóa *in vitro* và *in vivo*... Nhóm chất có vai trò quyết định nhất đến tác dụng dược lý của loài sâm này là các saponin triterpenoid mà đại diện chính là MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁ (Trần Công Luận, 2003). Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 - 15%) và lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới (Nguyễn Thương Dong *et al.*, 2007). Với những đặc điểm đó, sâm Ngọc Linh không chỉ là loài sâm quý của Việt Nam mà còn của cả thế giới.

Nhân giống sâm Ngọc Linh gặp nhiều khó khăn do chỉ trồng được ở khu vực quanh đỉnh núi Ngọc Linh, thời gian nuôi trồng kéo dài từ 6 đến 7 năm củ mới tích trữ đủ hoạt chất để thu hoạch. Nhân giống hữu tính theo cách thông thường (giao hạt) không cho kết quả cao vì nhiều lý do: khó thu nhận hạt, hạt

khí gieo nằm trong đất sau 1 thời gian dài mới nảy mầm, vì vậy hạt bị các loài động vật, côn trùng gặm nhấm ăn... ngoài ra tỷ lệ nảy mầm từ hạt chỉ đạt khoảng 30 - 40%. Theo số liệu điều tra mới nhất, sâm Ngọc Linh đã bị khai thác quá mức, dường như không còn thấy trong tự nhiên và chúng đang nằm trong danh mục 250 loài quý hiếm cần được bảo vệ. Do đó, yêu cầu cấp thiết là tìm được kỹ thuật mới giúp nhân giống nhanh và đem lại nguồn sinh khối có hiệu quả lấy từ loài cây dược liệu này. Trước đây đã có một số nghiên cứu trong nước thực hiện nhân nhân giống *in vitro* loài dược liệu này, tuy nhiên hiệu quả nhân giống và khả năng sống sót của cây con khi ra ngoài tự nhiên là không có vì cây yếu và không tạo được củ con ở phần gốc, khi áp dụng trồng thử nghiệm thì 100% cây đều chết (Nguyễn Ngọc Dung, 1995). Từ năm 2006 đến 2010, Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả đã bước đầu nghiên cứu nhân nhanh rễ thứ cấp của sâm Ngọc Linh; sử dụng kỹ thuật HPLC (High-performance liquid chromatography) nhằm xây dựng phương pháp định lượng ginsenoside-Rg₁, Rb₁ và MR₂ trong dịch chiết sinh khối sâm Ngọc Linh; tìm ra được một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối của cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* và bước đầu phân tích hàm lượng saponin, nhân giống vô tính thành công cây sâm Ngọc Linh, xác định được hàm lượng saponin và dự lượng một số chất

điều hòa sinh trưởng trong mô sẹo, chồi, rễ sẫm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* và bước đầu đã thu được một số kết quả khả quan.

Từ kết quả của những nghiên cứu trên và qua các khảo sát đã cho thấy rằng, một trong những đặc điểm dẫn đến sự khác biệt giữa cây sống sót khi trồng ngoài tự nhiên với cây bị chết chính là cây phải có củ phía dưới gốc. Củ này vừa đảm nhiệm vai trò là cơ quan dự trữ nguồn dinh dưỡng cung cấp cho cây khi ra ngoài tự nhiên, vừa là cơ quan sinh sản chứa các chồi non giúp cây nảy mầm khi rụng lá. Theo những khảo nghiệm ban đầu của Nhựt và đồng tác giả (2010), những cây sẫm Ngọc Linh khi đưa ngoài vườn ươm nếu có củ phía dưới gốc thì khả năng sống sót rất cao trên 90%.

Chính vì vậy, bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, chúng tôi đã nghiên cứu quy trình tạo củ cây sẫm Ngọc Linh giúp hoàn thiện quy trình nhân giống cây sẫm *in vitro* giúp cây con khi đưa ra ngoài vườn ươm có sức sống cao, rễ và củ phát triển tốt, thích nghi tốt với môi trường bên ngoài, góp phần cải thiện và tái tạo được một lượng cây đủ mật độ trồng tự nhiên. Với ưu thế những cây có củ này chúng ta cũng có thể có hy vọng trong việc di thực cây sẫm đến các khu vực có điều kiện tự nhiên tương tự để trồng và phát triển. Với kỹ thuật HPLC chúng tôi cũng đã xác định được hàm lượng saponin có trong các cây có củ, đảm bảo rằng cây nuôi cấy mô vẫn có đủ hoạt tính khi trồng ngoài tự nhiên.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu *in vitro*

Nguồn mẫu sử dụng là chồi cây sẫm Ngọc Linh *in vitro* tương đối đồng nhất và có chiều cao khoảng 1,5 cm, trọng lượng tươi khoảng 0,2 g đã ổn định qua 4 đến 5 lần cấy chuyển, hiện có tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo Giống cây trồng, Viện Sinh học Tây Nguyên.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962), $\frac{1}{2}$ MS (Môi trường MS có thành phần đa lượng giảm một nửa), SH (Schenk, Hidebrandt, 1972) và $\frac{1}{2}$ SH (Môi trường SH có thành phần đa lượng giảm một nửa) có bổ sung thêm 30 g/l đường sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính (AC), các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin (NAA), cytokinin (BA), gibberellin (GA_3) tùy thuộc vào từng thí

nghiệm sẽ bổ sung ở các nồng độ khác nhau. Sau điều chỉnh độ pH của môi trường từ 5,7 đến 5,8.

Điều kiện nuôi cấy

Trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ$ cường độ chiếu sáng khoảng 2500 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

Phương pháp

Khảo sát của môi trường khoảng MS, $\frac{1}{2}$ MS, SH và $\frac{1}{2}$ SH có bổ sung thêm 0,5 mg/l B.A, 0,5 mg/l NAA 1 g/l AC, 30 g/l sucrose

Môi trường MS, $\frac{1}{2}$ MS, $\frac{1}{2}$ SH và SH có thành phần vitamin, khoáng đa lượng và vi lượng khác nhau đáng kể. Do đó, mục tiêu của thí nghiệm này) so sánh ảnh hưởng của môi trường MS và môi trường SH đến khả năng tạo củ cây sẫm Ngọc Linh *in vitro* làm cơ sở cho các nghiên cứu các chất điều hòa tiếp theo. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tạo củ, trọng lượng tươi, chiều cao của chồi được thu nhận sau thời gian thí nghiệm là 14 tuần.

Khảo sát của nồng độ auxin và cytokinin đến sự hình thành củ

Các chồi sẫm được cấy vào môi trường SH có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 1 g/l AC và bổ sung nồng độ NAA (0,0, 0,5, 1,0, 2,0 mg/l) và BA (0,0, 0,5, 1,0, 2,0 mg/l) ở các nghiệm thức khác nhau. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tạo củ, trọng lượng tươi, chiều cao của chồi được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Khảo sát nồng độ của ABA lên sự hình thành, sinh trưởng và phát triển của củ sẫm Ngọc Linh *in vitro*

Các chồi sẫm Ngọc Linh được cấy vào môi trường SH có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 1 g/l AC, và ABA ở các nồng độ từ 0 đến 4 mg/l. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tạo củ, trọng lượng tươi, chiều cao của chồi được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của GA_3 lên sự hình thành, sinh trưởng và phát triển của củ sẫm Ngọc Linh

Các chồi sẫm Ngọc Linh được cấy trên môi trường SH có bổ sung 30 g/l đường sucrose, 1 g/l AC và GA_3 ở các nồng độ từ 0 đến 3 mg/l. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tạo củ, trọng lượng tươi, chiều cao của chồi được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Khảo sát nồng độ sucrose lên sự hình thành, sinh trưởng và phát triển của củ sẫm Ngọc Linh *in vitro*

Các chồi sẫm Ngọc Linh được cấy trên môi

trường SH có bổ sung đường sucrose ở các nồng độ từ 15 đến 70 g/l. Các chỉ tiêu như tỷ lệ tạo củ, trọng lượng tươi, chiều cao của chồi được thu nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Phân tích hàm lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh sau 17 tháng trồng ngoài vườn ươm

Các cây sâm Ngọc Linh *in vitro* có củ được trồng tại khu vực xã Tê Xăng, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum sau 17 tháng sinh trưởng và phát triển được thu nhận và sử dụng cho thí nghiệm này.

Bảng 1. Chương trình hệ pha động rửa giải.

Thời gian	ACN:Nước	Chương trình
0 - 10 phút	15.85 - 25.75	Tiêm tiến
10 - 20 phút	25.75 - 30.70	Tiêm tiến
20 - 40 phút	30.70 - 60.40	Tiêm tiến
40 - 60 phút	60.40 - 80.20	Tiêm tiến
60 - 100 phút	80.20	Đẳng mới

Điều kiện cho hệ thống HPLC (High-performance liquid chromatography)

Thế tích tiêm mẫu: 20 µl. Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút. Cột RP C18 Supelco (250 mm x 4,6 mm - 5 µm). Nhiệt độ cột: 25°C. Detector: PDA ở bước sóng phát hiện MR₂: 190 nm; G-Rb₁ và G-Rg₁: 203 nm. Pha giải mẫu các chuẩn trong dung môi ACN:Nước (70:30) có nồng độ như bảng 2.

Tiêm các dung dịch mẫu chuẩn vào máy HPLC với chương trình rửa giải, ghi nhận diện tích peak và dựng đường biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak.

Bảng 2. Nồng độ giai mẫu các chất chuẩn.

STT	MR ₂ (µg/ml)	G-Rg ₁ (µg/ml)	G-Rb ₁ (µg/ml)
1	72	19,4	24
2	144	38,8	48
3	216	58,2	72
4	288	77,8	96
5	360	97	120

Chuẩn bị mẫu thử

Cân khoảng 0,5 g sâm, chiết siêu âm với methanol cho đến khi kiệt hoạt chất, lọc. Tập trung dịch chiết cô quay áp suất giảm đến cạn. Hòa cần với 20 ml nước cất, siêu âm cho tan hết cần. Dịch nước

được lắc với ether ethylic (10 ml x 3 lần), loại dịch ether ethylic. Dịch nước được lắc tiếp với n-butanol bão hòa nước cho đến khi kiệt hoạt chất. Tập trung dịch n-butanol bão hòa nước cô đến cạn. Cần này được hòa lại trong hỗn hợp acetonitril và nước tỷ lệ (70:30), định mức chính xác 5 ml lọc qua màng 0,45 µm. Dịch lọc được tiêm vào máy HPLC ghi nhận diện tích peak

Công thức xác định hàm lượng:

$$X(\%) = Cx5x \frac{b}{p} x 10^{-6}$$

Trong đó: C: Nồng độ mẫu thử thu được dựa trên đường chuẩn (µg/ml). S: Độ pha loãng mẫu. b: Khối lượng 100 g nguyên liệu (g). p: Khối lượng nguyên liệu đem thử đã trừ ẩm (g).

Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phương pháp Duncan's test (Duncan, 1995) với P = 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát các môi trường khoáng MS, ½MS, SH, ½SH có bổ sung thêm 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 1 g/l AC, 30 g/l sucrose.

Sau 3 tháng nuôi cấy, cùng với sự phát triển của cây, từ gốc của các mẫu cây bắt đầu xuất hiện các củ ở hầu hết các môi trường. Đáng chú ý là ở môi trường SH tỷ lệ tạo củ là rất cao (90%) gấp đôi so với môi trường MS. Các chỉ tiêu khác như chiều cao và trọng lượng tươi cũng cao hơn so với các môi trường khác (Bảng 3). Củ hình thành trên môi trường này cũng to hơn hẳn so với trên môi trường MS và ½MS, củ có ít chồi, chồi có lá xanh tốt (Hình 1).

Trong môi trường SH hàm lượng các vitamin cao hơn rất nhiều so với môi trường MS, đặc biệt là thiamine (B1) cao gấp 50 lần và myo-inositol gấp 10 lần. Hầu hết các mô nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin cần thiết nhưng không đầy đủ về số lượng. Vitamin có vai trò xúc tác các quá trình trao đổi chất diễn ra trong tế bào, cho nên muốn đạt được sự sinh trưởng tối ưu của mô nuôi cấy thì các nhà nghiên cứu thường đưa thêm vào môi trường một số vitamin như: thiamin (vitamin B1), nicotinic acid (vitamin B3), vitamin B5, pyridoxine (vitamin B6). Trong số đó vitamin B1 được coi là vitamin thiết yếu đối với sự sinh trưởng và biến

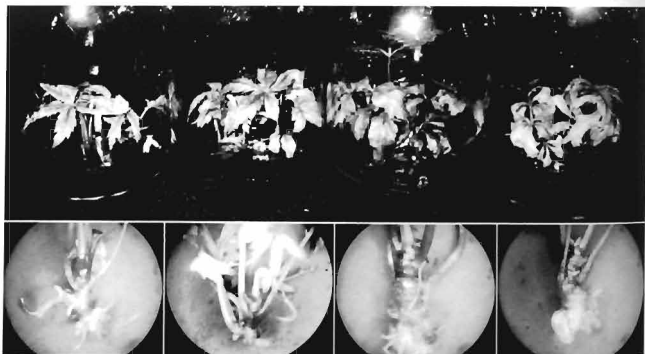
đường của tế bào thực vật. Sự phosphoryl hóa biến thiamin thành thiamin-pyrophosphate, chất này là cocarboxylase tương ứng với sự khử carboxyl của các ceton acid. Vitamin B1 được tổng hợp trong lá hay các chồi non (ánh sáng là yếu tố thiết yếu). Myo-inositol (hay meso-inositol) là một đồng phân của inositol, có vai trò quan trọng trong sự truyền tín hiệu hormon và liên kết với auxin (Bùi Trang Việt, 2002). Trong một số nghiên cứu về sâm, đặc biệt là

nghiên cứu của Pack và đồng tác giả (2000) thì môi trường SH lại tỏ ra rất hiệu quả để nuôi cấy rễ bất định cây Nhân sâm trong hệ thống bioreactor. Pack và đồng tác giả (2000) cũng đã báo cáo trong số các môi trường thử nghiệm thì môi trường SH cho số rễ trung bình cao nhất và sự tăng trưởng của rễ thì chịu ảnh hưởng mạnh bởi các chất điều hòa tăng trưởng thực vật cũng như các muối cơ bản của môi trường thử nghiệm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các môi trường khoáng MS, ½MS, SH, ½SH đến khả năng hình thành củ sâm Ngọc Linh.

Môi trường	Tỷ lệ tạo củ (%)	Chiều cao (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Hình thái củ
MS	43,33%	2,89cd*	0,20d	Củ nhỏ, chồi nhỏ, có nhiều rễ tơ
½MS	65,72%	3,51b	0,48b	Củ rất nhỏ, có nhiều chồi, không thấy rễ xuất hiện
SH	90%	4,08a	0,53a	Củ to, chắc, ít chồi, chồi to, rễ ít
½SH	61,50%	3,01c	0,40c	Củ to, ít rễ

Chu thích: *Nhưng chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với P = 0,05 trong Duncan's test



Hình 1. Củ sâm Ngọc Linh hình thành trên các môi trường khoáng lần lượt từ trái qua MS, ½MS, SH, ½SH

Thêm vào đó, ở môi trường SH không có mặt NH_4NO_3 cũng là một yếu tố dẫn đến sự tạo củ của cây. Trong sự phát triển và tăng trưởng của thực vật, nitrogen có vai trò chung là nguyên liệu để tổng hợp nên các amino acid, nucleotide, hormone và coenzyme. Tuy nhiên, trong sự hình thành và phát

triển củ, nitrogen lại có tác động như một chất ức chế quá trình tạo củ và tăng trưởng củ. Ở giai đoạn tạo củ, nếu nitrogen hiện diện ở hàm lượng cao sẽ làm tăng nồng độ GA nội sinh trong thực vật (GA ức chế quá trình tạo củ). Hơn nữa khi nitrogen hiện diện ở nồng độ cao, hình thành nên nhiều NH_3 trong lá,

tổng hợp nên các amino acid là những hợp chất rất cần cho sự tăng trưởng của các cơ quan sinh dưỡng hơn là tạo củ. (Nguyễn Du Sanh, 1998). Nitrogen ảnh hưởng lên sự tạo củ và tăng trưởng củ, do nó tác động lên sự phát triển thân. Khi cung cấp nhiều nitrogen khoáng, có ưu tiên phát triển chồi, thân, lá, không thích hợp cho sự tạo củ (Marschner, 1983). Sự giảm hàm lượng nitrogen thông qua việc giảm hàm lượng muối nitrat trong thành phần môi trường MS giúp cho sự hình thành củ (Zarrabeitia *et al.*, 1997).

Khi hàm lượng nitrogen thấp, có tác dụng làm giảm hay ngừng quá trình sinh sản sinh dưỡng, giúp khả năng tạo củ. Một số tác giả đã chứng minh liên quan giữa lượng nitrogen với hormon thực vật (Palmer, Smith, 1969; Wang, Hu, 1982). Nitrogen cao sẽ làm tăng lượng cytokinin giúp chồi tăng trưởng, làm ảnh hưởng đến sự hình thành củ. Ngược

lại, thiếu nitrogen, lượng ABA tăng cao giúp cho sự tạo củ (Krauss, Marchner, 1982; Haeder, Beringer, 1983).

Như vậy, ở môi trường SH nồng độ vitamin cao và sự suy giảm nitrogen trong môi trường đã tác động đến sự tạo củ thông qua việc làm giảm hay ngưng trệ sinh sản sinh dưỡng và giúp cho quá trình tích lũy chất dự trữ hình thành củ sấm Ngọc Linh.

Khảo sát các nồng độ auxin và cytokinin đến sự hình thành củ

Trong tạo củ *in vitro*, có nhiều sự cân bằng quan trọng cần thiết, nhất là cân bằng auxin/cytokinin và cân bằng GA/ABA. Trong thí nghiệm này, cân bằng auxin/cytokinin được khảo sát trên sự tạo củ sấm Ngọc Linh *in vitro* thông qua cân bằng của NAA và BA.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các nồng độ NAA và BA đến sự hình thành củ sấm Ngọc Linh.

Nghiem thức	NAA	BA	Trọng lượng tươi (g)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Hình thái củ
F1	0	0	0,33f	5,50e	41,40%	Củ rất nhỏ, có nhiều chồi bên
F2	0,5	0	0,47e	5,53de	0%	Không có củ, xuất hiện nhiều mô sẹo, rễ
F3	1	0	0,30fg	4,70g	35,18%	Củ rất nhỏ, rễ nhiều, dính kem mô sẹo
F4	2	0	0,23	2,40k	30,33%	Củ nhỏ, ít rễ, dính kem mô sẹo
F5	0	0,5	0,55cd	3,63i	0%	Không có củ, có xuất hiện mô sẹo, chồi
F6	0,5	0,5	0,91a	4,17h	0%	Không có củ, chồi nhiều
F7	1	0,5	0,74b	4,80g	0%	Không có củ, mô sẹo nhiều
F8	2	0,5	0,26g	4,27h	43,05%	Củ rất nhỏ, có rễ
F9	0	1	0,52de	5,93d	73,70%	Củ có nhiều chồi, ít rễ
F10	0,5	1	0,33f	4,20hi	65,30%	Củ to, chắc, có nhiều chồi, có rễ
F11	1	1	0,53d	5,17f	0%	Không có củ, nhiều mô sẹo
F12	2	1	0,32f	4,87g	0%	Không có củ, có rễ, ít mô sẹo
F13	0	2	0,44e	6,37c	79,16%	Củ có nhiều chồi nhỏ, có rễ to
F14	0,5	2	0,56c	8,80a	83,48%	Củ hình chóp có ít chồi, ít rễ
F15	1	2	0,45e	7,20b	89,75%	Củ hình chóp to, chắc, ít chồi, chồi to, rễ ít
F16	2	2	0,26g	3,05j	87,48%	Củ hình chóp to, ít rễ, chồi nhỏ

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c, ...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với P = 0,05 trong Duncan's test

Ở thí nghiệm từ F1 đến F4 trong môi trường chi bổ sung NAA, khi không có sự hiện diện của BA, tỷ lệ tạo củ rất thấp và củ hình thành ở các môi trường

này tương đối nhỏ, ở môi trường F2 có bổ sung 0,5 mg/l NAA hầu như không tạo củ (Bảng 4). Nhìn chung có sự tạo mô sẹo từ mẫu cấy trên môi trường

có bổ sung NAA. Nguyên nhân là do sự phân chia quá mức của lớp tế bào biểu bì và nhu mô vỏ do tác động kích thích phân chia tế bào của NAA (Bảng 4). Đường như sự phân chia này không xảy ra đồng thời với sự tích lũy tinh bột nên dạng mô sẹo này có màu trắng ngà, dễ hóa nâu, hơi đục. Khối mô sẹo này là một lớp tế bào không có hình dạng cố định do liên kết lỏng lẻo giữa các tế bào, chứa nhiều nước.

NAA có bản chất là một auxin. Theo Bùi Trang Việt (2000), auxin có vai trò là chất kích thích vùng tương tăng phân chia, ảnh hưởng lên hoạt động của tương tăng sinh mô, kích thích tạo mô sẹo và kích thích hình thành rễ sơ khởi nhưng lại ức chế sự tăng trưởng của rễ khi có mặt ở nồng độ cao.

Trong quá trình tạo củ, sau giai đoạn cảm ứng tạo củ, ở cơ quan tiền tạo củ thực vật bắt đầu phân chia và gia tăng kích thước tế bào đồng thời tích trữ chất dự trữ. Lúc này auxin đóng vai trò rất quan trọng, đặc biệt là kích thích sự phân chia và tăng rộng của các tế bào vùng tương tăng, tạo không gian tích trữ chất dự trữ (Nguyễn Du Sanh, 1998). Ngoài ra, auxin còn giúp cho tế bào tập trung chất dinh dưỡng, thu hút chất dinh dưỡng và gia tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào. Trong thí nghiệm tạo củ, khi phơi ra dưới cường độ ánh sáng cao củ sẽ có dạng bút chì. Điều này là do dưới tác động của ánh sáng, auxin bị phân hủy đồng thời tế bào mau hóa mộc (do mất nước) nên sự tăng trưởng không xảy ra (Nguyễn Du Sanh, 1998).

Ngược lại với môi trường chỉ bổ sung NAA, ở các môi trường F5, F9 và F13 chỉ bổ sung BA tương đương ở các nồng độ 0,5; 1 và 2 mg/l, chúng tôi nhận thấy ở nồng độ BA thấp (0,5 mg/l) không có sự tạo củ, tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ BA lên cao trong môi trường đã có sự hình thành củ, tỷ lệ hình thành củ cũng rất cao ở F9 (73,70%), F13 (79,16%), củ được tạo thành có mang theo nhiều chồi (Bảng 4).

Theo kết quả các nghiên cứu chung về sự tạo củ trước đây, vai trò của cytokinin rất quan trọng. Nhiều thí nghiệm cho thấy cytokinin có hoạt tính kích thích tạo củ mạnh hơn auxin và có vai trò quan trọng trong cả hai giai đoạn tạo củ. Hàm lượng và hoạt tính của cytokinin tăng cao trong suốt quá trình tạo củ ở Khoai tây. Trong giai đoạn đầu, cytokinin tập trung nhiều ở đầu mầm thân bò (stolon) Khoai tây và giúp tế bào này phân chia sau một thời gian và bắt đầu tích lũy tinh bột. Trong nghiên cứu về sự tạo củ của củ ồng, Nguyễn Du Sanh (1998) cũng ghi nhận thấy nồng độ cytokinin cao trong suốt quá trình tạo củ cả giai đoạn cảm ứng lẫn giai đoạn tăng trưởng củ Củ ồng. Cytokinin tác động

bằng cách kích thích tổng hợp enzyme tổng hợp bột starch synthase hay UDPG-udophosphoglycol đồng thời ức chế hoạt tính của enzyme phân giải tinh bột (Nguyễn Du Sanh, 1998; Bùi Trang Việt, 2000; Gabryszevska và Hempel (1985), Pierik và đồng nghiệp (1988) đã chứng minh rằng việc bổ sung BA kích thích phát triển thân rễ phân nhánh. Ở một số loài khác như Lily thì đòi hỏi nồng độ BA thấp trong quá trình tạo củ. Nồng độ BA cao được sử dụng cho tạo củ tạo củ Nghệ (Shirgurkar *et al.*, 2001; Sanghami Nayak, 2000).

Nhìn chung cytokinin có vai trò rất lớn trong sự hình thành củ chung ở các loài thực vật có củ. The kết quả của thí nghiệm này trên đối tượng cây sắn Ngọc Linh, có thể do lượng cytokinin nội sinh trong mô cấy thấp nên lượng BA ngoại sinh có hoạt tính thúc đẩy quá trình tạo củ.

NAA và BA khi kết hợp với nhau ở một nồng độ thích hợp tạo nên một sự cân bằng giữa auxin và cytokinin trong mô cấy và quyết định tạo chồi, tạo rễ hay hình thành củ. Ở nghiệm thức F14 khi bổ sung NAA (0,5 mg/l) kết hợp với BA (2 mg/l) đã cho thấy các chỉ số về trọng lượng tươi (0,56 g) và chiều cao (8,80 cm) là tốt nhất, tỷ lệ củ hình thành cao (83,48%), tuy nhiên ở nghiệm thức F15 có bổ sung NAA (1 mg/l) kết hợp với BA (2 mg/l) các chỉ số về trọng lượng tươi (0,45 g) và chiều cao (7,20 cm) không cao bằng nhưng hình thái cây và củ lại thể hiện tốt hơn, tỷ lệ hình thành củ (89,75 %) cao hơn (Bảng 4). Chồi cây hình thành từ nghiệm thức F15 to khỏe hơn so với chồi cây ốm yếu và cao của nghiệm thức F14. Củ sắn hình thành có hình chóp với chồi chính và các mắt ngủ nằm xung quanh các đốt tương tự như cây ngoài tự nhiên. Sự kết hợp của NAA và BA cho thấy các chỉ tiêu về tỷ lệ tạo củ, hình thái củ, trọng lượng tươi và chiều cao cây là tốt hơn khi bổ sung riêng lẻ.

Sự tạo mô sẹo, tạo củ hay các dạng bất thường của củ có thể do sự hoạt động quá mức của NAA và BA. NAA giúp cho sự phát sinh mô sẹo từ mẫu cấy còn BA giúp cho sự phân chia tế bào. Kết hợp hai chất điều hòa này theo một tỷ lệ thích hợp sẽ kích thích cho các quá trình phát sinh hình thái khác nhau. Zheng và đồng tác giả (2008) cho rằng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng một vai trò rất quan trọng trong sự hình thành các cơ quan, và đặc biệt nhận thấy có sự ảnh hưởng qua lại giữa auxin và cytokinin trong quá trình tạo củ gừng ở nồng độ đường cao. Raghu (1997) kết hợp giữa NAA và BA ở nồng độ tương đương cho sự hình thành củ Nghệ. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin cũng cảm ứng sự hình thành và phát triển

của cấu trúc lưu trữ như củ và rễ củ, thể hiện ở một số loài cây trồng như Khoai mỡ, Khoai tây và Lily (Ja'sik, Mantell, 2000; Ja'sik, Klerk, 2006; Kim *et al.*, 2005; Romanov *et al.*, 2000).

Như vậy, trên đối tượng cây sâm Ngọc Linh khi tạo củ cần có sự kết hợp NAA (1 mg/l) và BA (2 mg/l), mức cân bằng của auxin và cytokinin này cho tỷ lệ hình thành củ và hình thái củ là tốt nhất.

Khảo sát nồng độ của ABA lên sự hình thành, sinh trưởng và phát triển của củ sâm Ngọc Linh *in vitro*

Sự tạo củ được ghi nhận sau 2 tháng ở tất cả các nồng độ của ABA. Tần số tạo củ tăng dần khi gia tăng nồng độ ABA đến 3 mg/l, và bắt đầu suy giảm ở nồng độ cao (4 mg/l). Ở nghiệm thức có bổ sung 3 mg/l ABA tần số tạo củ cũng như trọng lượng tươi là cao hơn so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 5). Ở các nồng độ thấp, ABA kích thích nhẹ quá trình tạo củ, hình thái củ có dạng hình cầu. Vì ABA là chất ức chế tăng trưởng, ngăn cản sự tăng trưởng, kéo dài sự ngủ của chồi và hạt cho nên ở những cây có củ to, hình thái cây không được khỏe mạnh, có xu hướng dị dạng khi có mặt ABA ở nồng độ cao.

Như vậy, chúng ta có thể nhận thấy nồng độ ABA ngoại sinh có ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành củ sâm Ngọc Linh *in vitro*. ABA được hình thành trong lá, kích thích sự tạo củ đặc biệt. Một số nghiên cứu cho thấy cơ chế tác động của ABA lên quá trình tạo củ là do tác dụng kích thích hấp thu

sucrose trong các tế bào, làm tăng áp suất thẩm thấu (Nguyễn Du Sanh, 1998). Nhiều thí nghiệm cho thấy ABA khi tiến hành thử nghiệm xử lý ABA trên cây nguyên hay dốt thân tách rời đều có sự xuất hiện của ABA ở giai đoạn một (giai đoạn cảm ứng tạo củ) nhưng các phần này sẽ không tăng trưởng nếu tiếp tục xử lý với ABA.

Các báo cáo trên thế giới trước đây cũng đã chỉ ra rằng, trong thời gian dài ở nhiệt độ thấp lượng ABA nội sinh tăng lên ở các cây có củ, ngoài ra ABA còn được kích hoạt bởi một loạt các gen liên kết với nhiệt độ thấp, hạn hán, mặn, khô, protein lưu trữ, ngủ nghỉ, nảy mầm, đóng khí khổng (Gusta *et al.*, 2005). Khi qua giai đoạn ngủ đông, nhiệt độ ấm trở lại, lượng ABA suy giảm và dẫn tới giai đoạn phá ngủ hoàn toàn. Mối quan hệ giữa sự suy giảm ABA và phá ngủ đông đã được công bố với kết quả của nghiên cứu về *Polianthes tuberosa* (Nagar, 1995) và *Allium wakegi* (Yamazaki *et al.*, 1995; 1999a; b; 2002). Ở cây sâm Ngọc Linh, vào các mùa lạnh, cây cũng có cơ chế ngủ lá sinh lý và rơi vào trạng thái ngủ đông, điều này có thể đã tác động đến khả năng sản sinh ABA nội sinh trong cây, khiến củ phát triển trong các giai đoạn này.

Ngoài ra, Krauss và Marschner (1982) cho rằng ABA có thể ức chế tác động của GA. Trong khi GA kích thích sự kéo dài lông và dốt thân (sự tăng trưởng theo chiều dọc) thì ABA kích thích sự dốt hướng tăng trưởng, làm cho tế bào tăng trưởng theo chiều ngang.

Bảng 5. Ảnh hưởng của ABA đến sự hình thành củ sâm Ngọc Linh.

Nồng độ (mg/l)	Trọng lượng tươi (g)	Chiều cao (cm)	Tỷ lệ (%)	Hình thái củ
0	0,07f	2,1e	40%	Củ hình chóp nhỏ, không có rễ, ít chồi
0,1	0,17e	2,9de	35%	Củ hình cầu, có nhiều chồi
0,5	0,25d	3,6c	46%	Củ bầu, có rễ ở cuối củ
1	0,40ab	4,8a	50%	Củ hình chóp nhỏ có màu xanh đen, nhiều rễ
1,5	0,30c	3,0d	52%	Củ có nhiều chồi, ít rễ
2	0,37b	3,8bc	60%	Củ nhỏ, có nhiều chồi
3	0,42a	3,5c	66%	Củ có hình chóp, dài, ít rễ, chỉ có một chồi
4	0,35bc	3,7bc	61%	Củ hình chóp phình to, cây dị dạng, kém phát triển

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c ...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với P = 0,05 trong Duncan's test.

Khảo sát ảnh hưởng của GA₃ lên sự hình thành, sinh trưởng và phát triển của củ sấm Ngọc Linh

Sau 2 tháng nuôi cấy, với sự có mặt của GA₃ trong môi trường, khả năng tạo củ của sấm Ngọc Linh đã bị suy giảm. Ở các nghiệm thức có nồng độ GA₃ thấp, cây vẫn tạo củ nhưng với tỷ lệ không cao, củ nhỏ, cây kém phát triển. Khi gia tăng nồng độ đến 0,5 mg/l tỷ lệ tạo củ của cây chỉ còn 5%, nồng độ trên 0,5 mg/l cây không có khả năng tạo củ. Tuy ở nồng độ cao cây không tạo củ nhưng các chỉ số về trọng lượng tươi và chiều cao cây lại gia tăng, điều này có thể giải thích là do GA₃ đã kích thích sự phân bào và kéo dài tế bào mô phân sinh dưới đỉnh khiến cây cao lên (Bảng 6).

Vai trò của GA₃ trong việc kiểm soát sự hình thành củ cũng được một số tác giả ghi nhận: GA₃ được coi là chất cần tạo củ (Matthysse, Scott, 1984; Wareing, 1984; Chailakhyan, 1985), giảm hoạt động GA₃ dẫn đến sự tạo củ (Okazawa, 1988; Smith, Rappaport, 1969), thí nghiệm nếu cắt bỏ chồi và lá non, sự tạo củ không xảy ra, như vậy sự tạo củ không được kích thích bởi GA₃ (Vince Prue, 1985), ảnh hưởng của sự tạo củ có thể hạn chế nhờ thêm chlorochlorin (CCC) vào môi trường nuôi cấy. GA₃ đóng một vai trò quan trọng trong sự hình thành củ gừng và nâng cao trọng lượng tươi của củ *in vitro*

(Yongqiang Zheng *et al.*, 2008).

Mối liên hệ giữa tỷ lệ ABA/GA trong quá trình cảm ứng tạo củ cũng đã được các nhà khoa học nghiên cứu. GA/ABA được hình thành trong lá và ảnh hưởng trực tiếp đến sự hình thành củ.

Trong điều kiện ngày dài và nhiệt độ cao, GA được tổng hợp nhiều ở lá non trong khi ABA được tổng hợp ở lá thấp. Khi đó cả GA, ABA di chuyển xuống dưới về phía củ. Trong điều kiện ngày dài, ở cơ quan tạo củ, cân bằng GA/ABA nghiêng về phía GA, sự hình thành củ bị ức chế. Tương tự trong điều kiện ngày ngắn, nhiệt độ thấp, hàm lượng ABA tăng cao, cân bằng sẽ nghiêng về phía ABA, tỷ lệ GA/ABA thấp. Kết quả làm cân bằng ngăn kéo dài (ở khoai tây) và làm đổi hướng tăng trưởng, kích thích sự hình thành củ, tỷ lệ auxin/cytokinin cũng xuống thấp dẫn đến sự phân bào mãnh liệt ở các cơ quan tiền tạo củ, kích thích sự hình thành củ.

Ngoài ra nồng độ GA₃ và ABA cũng thay đổi mạnh với khi có sự gia tăng của sucrose (Zheng *et al.*, 2004).

Qua kết quả trên có thể thấy rằng GA₃ là một chất điều hòa quá trình hình thành củ là tác nhân kích thích kéo dài thân, ngăn cản sự tạo củ và tăng trưởng củ.

Bảng 6. Ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng hình thành củ sấm Ngọc Linh

Nồng độ (mg/l)	Trọng lượng tươi (g)	Chiều cao (cm)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Hình thái củ
0	0,36de*	3,90a	42%	Củ hình chóp, ít rễ
0,05	0,27e	2,85e	30%	Củ nhỏ, ít rễ, ít chồi
0,1	0,28e	2,57g	23%	Củ nhỏ hình chóp, có nhiều chồi
0,5	0,27e	3,69bc	5%	Củ nhỏ, phình, nhiều chồi, ít rễ
1	0,37d	3,71b	0%	
1,5	0,75a	3,50c	0%	
2	0,52c	3,30d	0%	
3	0,70b	2,51f	0%	

Chú thích: *Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với P = trong Duncan's test.

Khảo sát nồng độ của sucrose lên sự hình thành, sinh trưởng và phát triển của củ sấm Ngọc Linh *in vitro*

Đường là một trong những nhân tố quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật, ngoài các chất điều hòa

tăng trưởng thực vật thì nồng độ đường có ảnh hưởng đáng kể đến chiều cao, trọng lượng cây và khả năng tạo củ. Khi nồng độ đường sucrose trong môi trường thay đổi nó có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tạo củ của cây. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng môi trường SH có bổ sung sucrose

từ 15 đến 70 g/l và kết quả thu được cho thấy có sự khác biệt ở trọng lượng, chiều cao cây cũng khả năng tạo củ (Bảng 7).

Sau 2 tháng nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy ở nồng độ sucrose 50 g/l cho kết quả tốt nhất cho quá trình tạo củ sâm Ngọc Linh. Củ hình thành và kích thước tăng khi nồng độ đường tăng lên. Mặc dù tỷ lệ tạo củ khi ở nồng độ đường cao (70 g/l) lên đến 93% nhưng lúc này củ lại ngắn lại và héo úa ở nồng độ này (Bảng 7). Thực vật nhận năng lượng từ quá trình quang hợp. Tuy nhiên, trong nuôi cấy mô thực vật, cây con thiếu khả năng tự dưỡng do khiếm khuyết chức năng của lục lạp. Vì thế nguồn carbon bên ngoài rất quan trọng để sản xuất đủ lượng carbohydrate nhằm đáp ứng nhu cầu phát triển của tế bào.

Nguồn carbon sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật chủ yếu là đường sucrose, fructose, glucose và một ít là maltose, galactose, mannose, lactose. Tuy nhiên, nguồn carbon tốt nhất và phổ biến nhất trong nuôi cấy mô là sucrose ở nồng độ khoảng từ 2% - 5%. Khuri và Moorby (1995) đã lập thí nghiệm và nhận thấy sucrose được sử dụng nhanh hơn và tập trung ở rễ nhiều hơn. Điều đó cho thấy môi trường có chứa sucrose thích hợp cho sự tạo củ hơn các loại đường khác.

Theo các kết quả thu được gần đây, sucrose còn có vai trò điều chỉnh lượng GA (gibberellin) nội sinh trong cây thân củ (Xu *et al.*, 1998).

Nồng độ sucrose ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành củ và chất lượng của củ *in vitro*. Môi trường có nồng độ sucrose cao giúp tạo củ sâm Ngọc Linh với trọng lượng tươi cao (Bảng 7).

Vai trò của đường đối với sự hình thành củ đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng; đường là nguồn carbon cần thiết trong môi trường nuôi cấy và đồng thời là nguồn nguyên liệu quan trọng trong việc tích lũy tinh bột dẫn đến sự tạo củ và sự phình to của

củ *in vitro*. Dantu và Bhowani (1987) ghi nhận rằng nồng độ sucrose cao thích hợp cho sự hình thành củ có kích thước lớn trên hoa Lay-on (đường kính từ 10 đến 23 mm). Ở nồng độ sucrose thấp, khả năng tích lũy tinh bột thấp dẫn đến khả năng tạo củ hạn chế và trọng lượng tươi của củ thấp. Tương tự trong thí nghiệm này chúng tôi nhận thấy ở nồng độ đường cao (50 g/l) cho kích thước củ củ lớn nhất (Đương Tấn Nhật, 2007). Sucrose đóng một vai trò quan trọng trong hình thành củ gừng *in vitro*. Sucrose tạo bộ xương carbon và năng lượng cho cảm ứng và hình thành củ *Z. officinale* (Yongqiang Zheng *et al.*, 2008).

Trong chu trình tăng trưởng và phát triển của thực vật quá trình quang hợp tạo các sản phẩm đồng hóa. Một phần tham gia vào cấu trúc thực vật phát triển, một phần được tích lũy trong các cơ quan dự trữ như trái, hạt, thân, củ, bản thân cây, trong quá trình phát triển sẽ tự tích lũy chất đồng hóa dưới dạng củ (Nguyễn Du Sanh, 1998).

Những cấu trúc củ đặc biệt này có một hoặc hai chức năng sinh học. Trước hết, chúng là cơ quan dự trữ cacbon và nitrogen ở những dạng có thể cung cấp cho thực vật khi cần thiết. Chức năng thứ hai của chúng là cơ quan sinh sản. Trong trường hợp này, củ cần tích trữ đầy đủ lượng sinh dưỡng cần thiết cho nhu cầu sống độc lập của cây sau này. Các loài thực vật tạo ra các bộ phận đặc biệt này thường là các loại cây lưu niên. Sau một thời gian hay một mùa thực vật sẽ sống sót dưới dạng một cơ quan trong đất và ở trạng thái ngủ. Cơ quan này có mang sẵn chồi và sẽ tạo cây mới vào vụ sau. Cây sâm Ngọc Linh trong tự nhiên cũng vậy, chúng thường có một khoảng thời gian ở trạng thái ngủ, trụi lá và tàn đi, sau đó mới phát triển trở lại.

Như vậy, với việc bổ sung lượng đường sucrose với nồng độ 50 mg/l có thể giúp sâm Ngọc Linh tạo củ to và hình thái cây khỏe mạnh.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose đến khả năng hình thành củ sâm Ngọc Linh.

Sucrose (g/l)	Trọng lượng tươi (g)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Hình thái củ
15	0,34c	2,0e	33%	Củ nhỏ, có chồi nhiều
30	0,43b	2,5c	42%	Củ nhỏ, có rễ
45	0,46ab	2,9b	65%	Củ to, hơi phình
50	0,51a	3,1a	88%	Củ hình chóp, to
70	0,31c	2,2d	93%	Củ hình chóp nhỏ, cây kém phát triển

Chú thích: "Những chữ cái khác nhau (a, b, c,...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với P = 0,05 trong Duncan's test.

Phân tích hàm lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy ngoài vườn 17 tháng tuổi

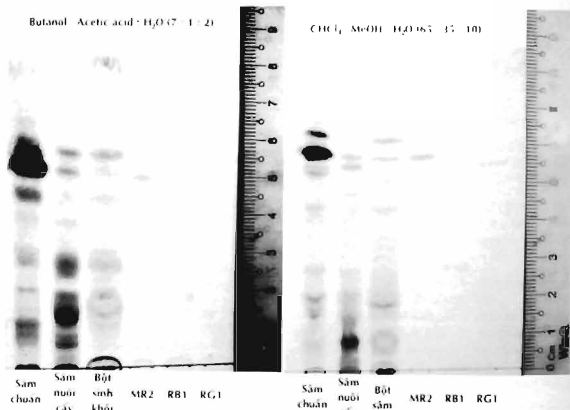
Định tính saponin trong cây sâm Ngọc Linh 17 tháng tuổi

Đưa vào vi trí và màu sắc các vết trên bản mỏng thu được chúng tôi xác định Rf của các vết chất. Kết quả cho thấy trong các sinh khối có cả 3 vết màu hồng tím tương ứng với 3 vết của chất chuẩn MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁. Trong đó, sinh khối chồi củ MR₂ và G-Rg₁ tách vết rõ, tương ứng với vết của chất chuẩn tương thích, riêng G-Rb₁ có vùng tương ứng với chất chuẩn nhưng không tách vết rõ, trong khi mẫu sâm trồng 17 tháng tuổi có đủ 3 thành phần hợp chất saponin chính. Mặt khác, ngoài 3 vết chuẩn nêu trên trong mẫu sinh khối chồi và cây 17 tháng tuổi còn có nhiều vết khác tương ứng với mẫu saponin

loại phân sâm Ngọc Linh điều đó chứng tỏ rằng trong sâm Ngọc Linh nuôi cấy *in vitro* còn có chứa nhiều loại saponin khác tương tự với sâm Ngọc Linh trong tự nhiên.

Định lượng saponin trong cây sâm Ngọc Linh 17 tháng tuổi

Chúng tôi nhận thấy sau khoảng 25 phút xuất hiện đỉnh của G-Rg₁, 28 phút xuất hiện đỉnh của MR₂ và 36 phút xuất hiện đỉnh của G-Rb₁. Ở bước sóng 190 nm các đỉnh xuất hiện rõ nhưng có hiện tượng trôi đường nền, ở bước sóng 203 nm không thấy rõ đỉnh của MR₂ (Hình 2, 3, 4). Đồng thời chúng tôi xác định được phương trình tuyến tính, hệ số tương quan của ba loại saponin MR₂, G-Rg₁, G-Rb₁, cũng như xác định được giới hạn định lượng và giới hạn phát hiện của chúng.



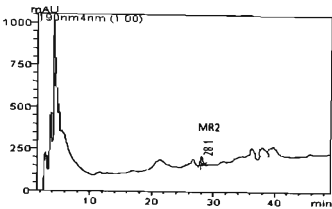
Hình 2. Sắc ký đồ MR₂, G-Rb₁, G-Rg₁ trên mẫu sâm Ngọc Linh 17 tháng tuổi so với sâm tự nhiên và sinh khối chồi

Như vậy, qua kết quả định tính bằng sắc ký lớp mỏng và định lượng bằng HPLC, dựa trên sự đối chiếu với 3 chất chuẩn có được và so sánh với sâm Ngọc Linh tự nhiên, có thể thấy các cây 17 tháng tuổi có sự hiện diện của MR₂, G-Rb₁ và G-Rg₁. Hàm lượng MR₂ chiếm tỷ lệ cao hơn hẳn so với G-Rg₁ và

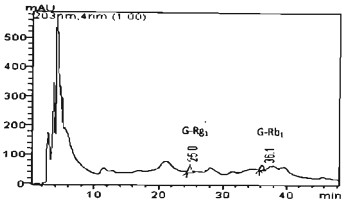
G-Rb₁ (Bảng 8). Kết quả này chứng tỏ rằng dưới điều kiện tự nhiên những cây có nguồn gốc *in vitro* vẫn có khả năng kích thích các tế bào trong quá trình sinh tổng hợp nên MR₂ một loại saponin chủ yếu của thân rễ và rễ củ sâm Ngọc Linh. Về thành phần các saponin và mức độ tương đồng của saponin trong các

cây nuôi cấy có nguồn gốc *in vitro* so với thân rễ và rễ củ sâm Ngọc Linh tự nhiên trên sắc ký đồ HPLC (Hình 8), cho thấy cả hai sắc ký đồ của mẫu sinh khối chồi và sâm Ngọc Linh có sự tương đồng cao, có thể đánh giá thành phần các saponin của cây 17 tháng tuổi tương đồng với saponin trong thân rễ và rễ

củ của cây tự nhiên.
Với những kết quả này chúng ta có thể tin tưởng rằng những cây có nguồn gốc *in vitro* khi đem trồng ra ngoài tự nhiên vẫn có đầy đủ các hoạt chất và hoạt tính như cây sâm tự nhiên. Xóa bỏ đi nỗi lo ngại về cây nuôi cấy mô mà không có hoạt chất.



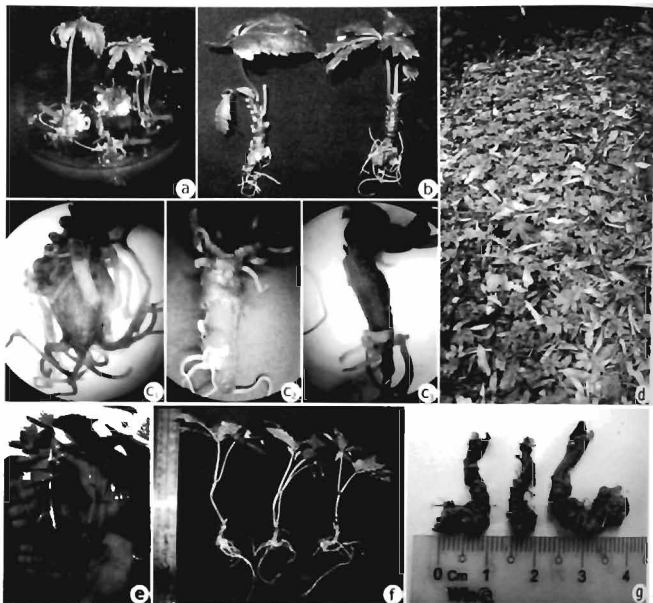
Hình 3. Peak MR₂ trên sắc kí đồ HPLC của saponin toàn phần sâm nuôi cấy được trồng 17 tháng ở bước sóng 190 nm.



Hình 4. Peak G-Rg₁, G-Rb₁ trên sắc kí đồ HPLC của saponin toàn phần sâm nuôi cấy được trồng 17 tháng ở bước sóng 203 nm.

Bảng 8. Hàm lượng các saponin trong cây sâm Ngọc Linh 17 tháng tuổi.

Khối lượng nguyên liệu (mg)	Saponin chuẩn	Diện tích peak	Hàm lượng saponin trong mẫu	Hàm lượng (%) saponin trong mẫu	Hàm lượng (%) saponin trong mẫu tính theo được liệu khô kiệt	Hàm lượng (%) saponin trung bình
532	G-Rg ₁	234242	0,8136	0,15	0,17	0,17
		234156	0,8133	0,15	0,17	
		234317	0,8138	0,15	0,17	
	MR ₂	787585	3,6997	0,69	0,77	0,77
		787551	3,6996	0,69	0,77	
		787498	3,6993	0,69	0,77	
	G-Rb ₁	826019	1,0074	0,18	0,21	0,21
		825989	1,0073	0,18	0,21	
		826120	1,0075	0,18	0,21	



Hình 5. Củ sâm Ngọc Linh *in vitro*, sự phát triển của cây sâm có củ tại núi Ngọc Linh và mẫu sâm phân tích. a. Củ sâm Ngọc Linh *in vitro*; b. Cây sâm có củ trước khi đưa ra ngoài vườn ương; c₁, c₂, c₃. Các dạng củ sâm *in vitro*; d. Vườn trồng sâm có củ tại khu vực xã Tế Xáng, huyện Tu Mơ Rông, tỉnh Kon Tum; e. Cây sâm 17 tháng tuổi được thu thập tại vườn; f. Cây sâm có củ 17 tháng tuổi trước khi phân tích; g. Củ sâm sấy khô được loại bỏ lá trước khi phân tích.

KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp nhất để tạo củ sâm Ngọc Linh *in vitro* là SH có bổ sung 1 mg/l NAA, 2 mg/l BA trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Các hệ phức hợp của GA/ABA và auxin/cytokinin trong quá trình hình thành củ cũng đã được khảo sát. Nồng độ ABA thích hợp nhất cho quá trình tạo củ là 3 mg/l. GA₃ ức chế khả năng tạo củ *in vitro* cây sâm Ngọc Linh. Nồng độ đường sucrose tốt nhất cho quá trình tạo củ sâm là 50 g/l. Qua hệ thống HPLC chúng tôi

cũng đã nhận thấy trong cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy mô trồng thử nghiệm 17 tháng tại núi Ngọc Linh có chứa cả 3 loại saponin quan trọng của Sâm Ngọc Linh đó là MR₂, Rg₁, Rb₁. Hàm lượng saponin trong củ của những cây này cũng đã được xác định là MR₂ (0,77%), G-Rg₁ (0,17%), G-Rb₁ (0,21%).

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn Ban Khoa học và Công nghệ địa phương - Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho đề tài nghiên cứu.

này. Đề tài thuộc nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp thiết mới phát sinh ở địa phương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Trang Việt (2000) *Sinh thực vật đại cương - Phần II: Phát triển*. Nhà xuất bản Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

Bùi Trang Việt (2002) *Sinh lý thực vật đại cương - Phần II: Phát triển*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.

Chailakhyan MKH (1985) Hormonal regulation of reproductive development in higher plants. *Bio Plant (Praha)* 27: 292-302.

Dantu PK, Bhojwani SS (1987) *In vitro* rapid shoot proliferation and corm development on *Gladiolus grandiflorus* cv. Redbrand. *Plant Cell Tiss Cult* 5: 7-12.

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.

Dương Tấn Nhứt, Lê Thị Diễm, Đặng Thị Thu Thủy, Nguyễn Duy (2007) Ảnh hưởng của sucrose, IBA và điều kiện nuôi cấy lên sự hình thành củ *in vitro* từ chồi của cây hoa lay-ơn (*Gladiolus* spp.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1): 67-75.

Dương Tấn Nhứt, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bà Trục, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Tình, Vũ Quốc Luân, Nguyễn Văn Bình, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Lê Nữ Minh Thủy, Lý Thị Mỹ Nga, Thái Thương Hiền, Nguyễn Thành Hải (2010) Nhân giống vô tính cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 8(3B): 1211-1219.

Gabryszevska E, Hempel M (1985) The influence of cytokinins and auxins on *Alstroemeria* in tissue culture. *Acta Hort* 167: 295-300.

Gusta LV, Trischuk R, Weiser CJ (2005) Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. *J Plant Grow Reg* 24:308-318.

Haeder, Beringer (1983) *In potential productivity of field crops under different environments*. Yoshida S, ed. IRRRI: 307-317.

Ja'sik J, Mantell SH (2000) Effects of jasmonic acid and its methyl ester on *in vitro* microtubers of three food yam (*Dioscorea*) species. *Plant Cell Rep* 19: 863-867.

Ja'sik J, Klerk GJ (2006) Effect of methyl jasmonate on morphology and dormancy development in lily bulblets regenerated *in vitro*. *J Plant Grow Reg* 25: 45-51.

Khuri S, Moorby J (1995) Investigation into the role of sucrose in potato: Estima microtuber production *in vitro*. *Ann Bot* 75: 295-303.

Kim SK, Kim JT, Jang SW, Lee SC, Lee BH, Lee JJ (2005) Exogenous effect of gibberellins and jasmonate on tuber enlargement of *Dioscorea opposita*. *Agr Res* 3:39-44.

Krauss A, Marschner H (1982) Influence of nitrogen nutrition, day length and temperature on contents of GA, ABA and on tuberization in potato plants. *Potato Res* 25: 13-21.

Marschner H (1983) *General introduction to the mineral nutrition of plant. In inorganic plant nutrition. Encyclopedia of plant physiology*. Springer Verlag, Berlin 15: 5-60.

Matthysse AG, Scott TK (1984) *Function of hormones at the whole level of organization. In hormonal regulation of development II. The function of hormones from the level of the cell to the whole plant. Encyclopedia of plant physiology*. Springer Verlag, Berlin 10: 219-243.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* (15): 473-497.

Nagar PK (1995) Changes in abscisic acid, phenols and indoleacetic acid in bulbs of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) during dormancy and sprouting. *Sci Hort* 63: 77-82.

Nguyễn Du Sanh (1998) Sự tăng trưởng của củ có ông (*Panicum Repens* L.) trong thiên nhiên. *Luận án Tiến sĩ Sinh học*. Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh.

Nguyễn Ngọc Dung (1995) *Nhân giống sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.) bằng con đường sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp: 43-100.

Nguyễn Thuận Dong, Trần Công Luận, Nguyễn Thị Thu Hương (2007) *Sâm Việt Nam và một số cây thuốc họ Nhân sâm*. NXB Khoa học và Kỹ thuật. 109-110.

Okazawa Y (1988) Isolation of specific potato tuber including substance from potato leaves. *Plant Cell Physiol* 29: 1047-1051.

Palmer, Smith (1969) Cytokinins and tuber initiation in the potato (*Solanum tuberosum* L.). *Nature* 221: 279-280.

Park SJ, Kim SM, Kim MH, Kim CS, Lee CH (2000) Development of a prototype continuous flow dryer using far infrared ray and heated-air for white ginseng. *J Korean Soc Agr Mac* 25(2): 115-122.

Pierik RLM, van Voorst A, Booy G, van Acker CAM, Lehelv CLC, de Wit JC (1988) Vegetative propagation of *Alstroemeria* *in vitro*. *Acta Hort* 226: 81-89.

Raghu RV (1997) *Micropropagation of nurmeric (Curcuma longa L.) by in vitro microrhizomes*. In Edison S, Ramana KV, Saskumar B, Nirmal BK, Santhosh JE, eds. *Biotechnology of spices, medicinal and aromatic crops*. Indian Society for Spices, Calicut, Kerala, India.

Romanov GA, Aksenova NP, Konstantinova TN,

- Golyanovskaya SA, Kossmann J, Willmitzer L (2000) Effect of indole-3-acetic acid and kinetin on tuberisation parameters of different cultivars and transgenic lines of potato *in vitro*. *Plant Grow Reg* 32: 245-251.
- Sanghamitra N, Nayak S (2000) *In vitro* microrhizome production in four cultivars of turmeric (*Curcuma longa* L.) as regulated different factors. In *spices and aromatic plants-challenges and opportunities in the new century*. Indian Society for Spices, Calicut, Kerala, India
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Shirgurkar MV, John CK, Nadgouda RS (2001) Factors affecting *in vitro* microrhizome production in turmeric. *Plant Cell Tiss Org Cult* 64: 5-11.
- Smith OE, Rappaport L (1969) Gibberellins, inhibitors, and tuber formation in the potato (*Solanum tuberosum*). *Am J Potato Res* 67: 835-847.
- Trần Công Luận (2003) Kết quả nghiên cứu về hóa học sâm Việt Nam. Hội thảo bảo tồn và phát triển sâm Ngoc Linh tại tỉnh Quảng Nam: 62-75.
- Vince Prue D (1985) *Photoperiod and hormone. In hormonal regulation of development III. Encyclopedia of plant physiology*. Springer Verlag, Berlin 11: 308-364
- Wang PJ, Hu CY (1982) *Potato tissue culture and its application in Agriculture*. In Li PH, ed. *Potato Physiology* 503-57.
- Wareing PF (1984) *The physiology of tuber formation and the role of phyto hormones. In hormonal regulation of plant ontogenesis*. The USSR Academy of Science. K A Timiriazev Institute of Plant Physiology: 55-70.
- Xu X, Van Lammeren AAM, Vermeer E, Vreudenhil D (1998) The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation *in vitro*. *Plant Physiol* 117: 575-584
- Yamazaki H, Nishijima T, Koshioka M (1995) Changes in abscisic acid content and water status in bulbs of *Allium wakegi* Araki throughout the year. *J Jpn Soc Hort Sci* 64: 589-598
- Yamazaki H, Nishijima T, Yamato Y, Koshioka M, Miura M (1999a) Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone. *Plant Grow Reg* 29: 189-194
- Yamazaki H, Nishijima T, Yamato Y, Hamano M, Koshioka M, Miura M (1999b) Involvement of abscisic acid in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. II. A comparison between dormant and nondormant cultivars. *Plant Grow Reg* 29: 195-200
- Yamazaki H, Nishijima T, Koshioka M, Miura H (2002) Gibberellins do not act against abscisic acid in the regulation of bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. *Plant Grow Reg* 36: 223-229
- Yongqiang Zheng, Yanmei Liu, Mi Ma, Kun Xu (2008) Increasing *in vitro* microrhizome production of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Acta Physiol Plant* 30: 513-519
- Zarrabettia A, Lejarcegui X, Veramendi J, Mingo Castel AM (1997) Influence of nitrogen supply on micropropagation and subsequent microtuberization of four potato cultivars. *Amer Potato J* 74: 369-378.
- Zheng YQ, Liu YM, Xu K (2004) Effects of sucrose concentration on growth and endohormone concentration variations of tubeginger. *China Veg* 2: 15-17.

FACTORS EFFECTING *IN VITRO* MICRORHIZOME FORMATION OF *PANAX VIETNAMENSIS* HA ET GRUSHV. AND QUANTITUATION OF SAPONIN CONTENT OF THERE FROM GENERATED PLANTLETS GROWN IN NGOC LINH MOUNTAIN

Hoang Xuan Chien¹, Ngo Thanh Tai¹, Nguyen Ba Truc¹, Tran Xuan Tinh¹, Lam Bich Thao², Tran Cong Luan², Duong Tan Nhut^{1,*}

¹Tay Nguyen Institute of Biology

²Research Center of Ginseng and Medicinal Materials, Hochiminh City

SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) is a well-known Vietnamese ginseng for its rich pharmaceutical compositions in which saponins are the most important components. In an effort to preserve and development this precious medicinal species, the application of tissue culture techniques is considered an effective solution. The growth and development of microrhizome-derived plantlets was enhanced. It would be

* Author for correspondence; Tel: 84-63-3831056, Fax: 84-63-3831028, E-mail: duongtannhut@gmail.com

high survival rate when acclimatized in the field. In this study, *in vitro* microrhizome formation and determination of saponins in 17 month-old plant were presented. Microrhizome formation was induced from the *in vitro* shoots of *Panax vietnamensis* on SH medium containing 1 mg/l NAA and 2 mg/l BA under 16h-photoperiod. The effect of GA/ABA or auxin/cytokinin microrhizome formation was also investigated. The most suitable ABA concentration for the microrhizome formation was 3 g/l. GA₃ inhibited microrhizome formation of Ngoc Linh ginseng. The most suitable sucrose concentration for the formation of microrhizome was 50 g/l. The rhizomes of 17 month-old plant growing in the wild were carefully selected in order to identify G-Rb₁, G-Rg₁, MR₂ concentrations which were 0.21, 0.17 and 0.77, respectively.

Keywords. ABA, GA, G-Rb₁, G-Rg₁, microrhizome, MR₂, Ngoc Linh Ginseng, *Panax vietnamensis*, rhizome, saponins